

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460715

研究課題名(和文)膜小胞を介した癌の情報伝達機構の解明と腫瘍マーカー探索のためのプロテオーム解析

研究課題名(英文)Proteomic analysis of membrane vesicles for elucidation of tumor communication mechanism and identification of tumor markers

研究代表者

久米 秀明 (Kume, Hideaki)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・研究員

研究者番号：50322714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌患者組織膜画分のプロテオーム解析で同定した大腸癌のバイオマーカー候補となるタンパク質について、血清細胞外小胞画分における発現解析をおこなった。転移なし、または転移ありの大腸癌患者および健常者の血清から超遠心法を用いて調製した血清細胞外小胞画分をSRM法で解析したところ、20種類のマーカー候補タンパク質が検出された。その中の3つのタンパク質は、転移のある大腸癌患者の血清細胞外小胞画分で有意に増加していた。さらに、別検体セットの解析では、健常者に比べて、初期の段階を含む癌患者での有意な増加が示されたことから、これらのタンパク質は、有用な腫瘍マーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We have previously performed quantitative proteomic analysis of membrane fractions prepared from colorectal cancer tissues and benign polyps for biomarker discovery. In this study, we investigated whether the biomarker candidates could be detected in extracellular vesicle (EV) fraction prepared from serum samples. The EV fraction was prepared from serum samples of controls and colorectal cancer patients with or without metastasis by ultracentrifugation. A total of 20 proteins were quantitated by selected reaction monitoring (SRM) and three of them were shown to be increased in cancer patients with metastasis compared with controls or cancer patients without metastasis. In addition, these proteins were significantly elevated even in early stages compared with control in an independent set of patient samples. Accordingly, these proteins may be useful tumor markers for the diagnosis of colorectal cancer.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：癌 プロテオミクス 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、早期に発見し、手術を行えば、完治する確率が高く、転移や術後の再発を予測することができれば、患者の負担を軽減し、より適切な治療をおこなうことが可能となる。しかしながら、従来の腫瘍マーカーは、陽性率が低く、早期発見のための検査に有用ではなく、再発予測のマーカーとして、遺伝子発現プロファイルや血中循環癌細胞の検出などが検討されていたが、未だ十分なものとはいえず、早期診断や再発予測に役立つ新たな腫瘍マーカーが必要とされていた。

また、細胞から分泌されるエクソソームやマイクロベジクルと呼ばれる膜小胞(細胞外小胞)が、他の細胞に取り込まれることで、細胞間の情報が伝達に関与していることが示唆されていた。細胞外小胞は、産生細胞由来のタンパク質や核酸を含み、血液、尿などの体液中にも存在することから、新たな有用なバイオマーカーリソースとしても着目されていた。さらに、細胞外小胞と様々な疾患との関連性が報告され、癌では、癌細胞や周囲の正常細胞が産生する細胞外小胞が、癌の増殖、浸潤・転移に関与することが報告されていた。本研究と同様に細胞外小胞に含まれるタンパク質に着目し、大腸癌患者血液から調製した膜小胞画分のプロテオーム解析をおこなった報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

効果的な癌治療をおこなうために、早期発見や再発予測に有用な新たなバイオマーカーの開発が求められている。我々は、新規の有用な大腸癌バイオマーカータンパク質を明らかにすることを目的として、プロテオミクス的手法を用いて、大腸癌患者血液から調製した細胞外小胞画分の解析をおこなった。また、以前に大腸癌患者組織膜画分のプロテオーム解析で同定した大腸癌のバイオマーカー候補タンパク質について、血中細胞外小胞画分における発現解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 血清サンプルからの細胞外小胞画分の調製とプロテオーム解析

血清細胞外小胞画分は、超遠心法を用いて調製した。PBS で希釈した血清サンプルは、低速遠心後、その上清をフィルター濾過した。さらに、超高速遠心をおこない、その沈殿画分を血清細胞外小胞画分として得た。血清細胞外小胞画分は、可溶化し、還元・アルキル化後、トリプシン消化した。脱塩精製後、得られたペプチドサンプルは、分画後、質量分析計(Q-Exactive Plus)を用いて測定し、解析ソフト Proteome Discover を用いてデータベース検索することでプロテオーム解析をおこなった。

(2) SRM 法を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検証(プール血清での解析)

以前におこなった大腸癌患者組織膜画分の網羅的な定量解析により得られたバイオマーカー候補タンパク質について、SRM 法を用いて検証した。候補タンパク質のアミノ酸配列情報を基に、SRM 法で特異的に検出されるペプチド(トリプシン消化断片)を1または2種類ずつ選択し、それぞれに対する安定同位体標識ペプチド(SI ペプチド)を合成し、内部標準ペプチドとして用いた。健常者、大腸癌患者(転移なし、または転移あり)の4検体ずつのプール血清から細胞外小胞画分を調製し、トリプシン消化後、内部標準ペプチドを加え、TSQ Vantage 質量分析計を用いた SRM 法により相対定量解析を行った。

(3) SRM 法を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検証(個別検体での解析)

プール血清を用いた SRM 測定で検出された 20 種類の候補タンパク質について、健常者、大腸癌患者(転移なし、または転移あり)の個別検体から血清細胞外小胞画分を調製し、SRM 測定をおこなった。

4. 研究成果

解析に用いた細胞外小胞画分は、血清サンプルから超遠心法で調製した。得られた血清細胞外小胞画分では、血清に多量に含まれるアルブミンなどの血中多量タンパク質の多くが除かれ、100 nm ほどの小胞膜構造が観察された(図1)。また、調製した血清細胞外小胞画分のプロテオーム解析をおこなったところ、細胞外だけでなく、細胞膜や細胞質、核などに局在するタンパク質も多く同定された。

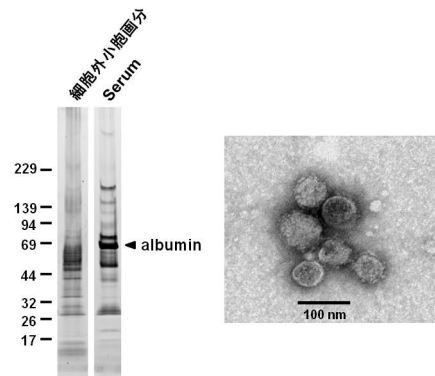


図1. 血清サンプルからの血清細胞外小胞画分の調製

解析は、初めに、健常者、大腸癌患者(転移なし、または転移あり)のプール血清から調製した細胞外小胞画分でおこなった。以前に我々がにおこなった大腸癌患者組織膜画分のプロテオーム解析で得られたバイオマーカー候補タンパク質の中の 72 種類について、SRM/MRM 測定をおこなった。その結果、20 種類のタンパク質が検出された。

そこで、検出された 20 種類のタンパク質について、健常者 20 検体、大腸癌患者 37 検体(転移なし 18 検体と転移あり 19 検体)の合計 57 検体の血清サンプルでの SRM/MRM 測定をおこなった。その結果、幾つかのタンパ

ク質は、癌の悪化に伴う有意な変化を示し、その中の protein A, B, C の3つのタンパク質は、健常者や転移なしの大腸癌患者に比べて、転移ありの大腸癌患者の血清細胞外小胞画分で有意に増加した(図2)。

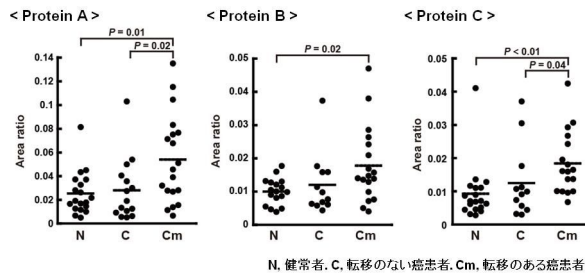


図2. 個別検体サンプルから調製した血清細胞外小胞画分のSMR測定

この3つのタンパク質について、転移を予測するマーカーとして有用であるかをROC曲線解析で検討したところ、ともに高いAUC値を示した。したがって、この3つのタンパク質は、転移や再発を予測するマーカーとなる可能性が示唆された(図3)。

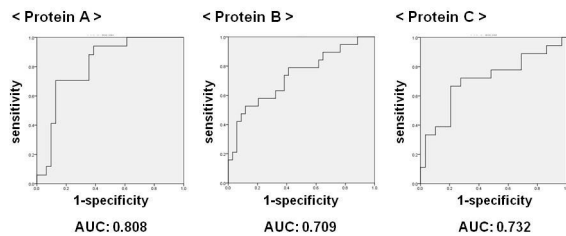


図3. ROC曲線解析によるprotein A, B, Cの転移マーカーとしての有用性の検討

次に、別検体セットから血清細胞外小胞画分を調製し、先述の3つのタンパク質について、SRM測定をおこなった。また、この測定の際には、濃度の確かな同位体標識ペプチド(AQUAペプチド)を内部標準として加えた。その結果、このサンプルセットでは、転移の有無に関わらず、健常者に比べて、大腸癌患者で3つのタンパク質が有意に増加していることが示された(図4)。そこで、これらのタンパク質について、腫瘍の有無を診断するマーカーとして有用であるかをROC曲線解析で検討したところ、ともに高いAUC値を示した。

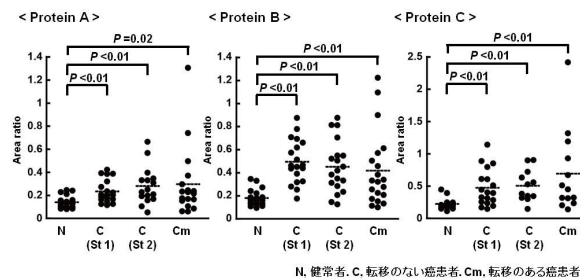


図4. 別検体セットから調製した血清細胞外小胞画分のSMR測定

本研究により、大腸癌患者組織膜画分のプロテオーム解析で同定されたマーカー候補タンパク質の20個が、血清細胞外小胞画分で検出された。その中の3つのタンパク質は、健常者や転移のない大腸癌患者に比べて、転移のある大腸癌患者の血清細胞外小胞画分で有意に増加していたことから、転移・再発

を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。また、別検体セットを用いた解析をおこなったところ、転移の有無に関わらず、健常者に比べて、大腸癌患者で有意な増加がみられた。また、初期の大腸癌患者でも有意に増加し、既存の腫瘍マーカーと組み合わせることで、感度良く癌の有無を判定するマーカーとなる可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Kume H.*, Muraoka S., Kuga T., Adachi J., Narumi R., Watanabe S., Kuwano M., Kodera Y., Matsushita K., Fukuoka J., Masuda T., Ishihama Y., Matsubara H., Nomura F., Tomonaga T. (2014) Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis. *Mol Cell Proteomics*. 13(6):1471-84. DOI: 10.1074/mcp.M113.037093

Kuga T., Kume H., Kawasaki N., Sato M., Adachi J., Shiromizu T., Hoshino I., Nishimori T., Matsubara H., Tomonaga T. (2013) A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci*. 126(Pt 20), 4721-31. DOI: 10.1242/jcs.129684

Muraoka S., Kume H., Adachi J., Shiromizu T., Watanabe S., Masuda T., Ishihama Y., Tomonaga T. (2013) In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. *J Proteome Res*. 12(1), 208-13. DOI: 10.1021/pr300824m

〔学会発表〕(計 7件)

久米秀明、星野敢、松原久裕、朝長毅、第74回日本癌学会「血中細胞外小胞のプロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索」(2015)名古屋

久米秀明、星野敢、松原久裕、朝長毅、第35回日本分子腫瘍マーカー研究会「血中細胞外小胞のプロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索」(2015)名古屋

久米秀明、小松亜紀、星野敢、松原久裕、朝長毅、第11回日本プロテオーム学会「SRM/MRM法を用いた血中細胞外小胞画分における大腸癌バイオマーカー候補タン

パク質の検証」(2015)熊本

久米秀明,橋本裕希,村岡賢,松原久裕,朝長毅, 血中膜小胞画分のプロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索、第1回日本細胞外小胞学会、2014. 8. 28、広島

久米秀明,橋本裕希,村岡賢,松原久裕,朝長毅, 血中膜小胞画分のプロテオーム解析による大腸癌バイオマーカータンパク質の探索、第12回日本プロテオーム学会、2014. 7. 17、つくば

久米秀明,村岡賢,久家貴寿,足立淳,小寺義男,石濱泰,松原久裕,朝長毅, 大腸癌組織膜タンパク質のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索とSRM/MRM法を用いたその検証、第62回質量分析総合討論会、2014. 5. 14、大阪

Kume H, Muraoka S, Hashimoto Y, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Fukuoka J, Kodera Y, Matsushita K, Matsubara H, Tomonaga T., Discovery and subsequent validation of biomarkers for colorectal cancer by large-scale proteomic analysis and tissue microarray analysis, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, 2013. 9. 15, Yokohama

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：大腸がんの転移検出方法
発明者：朝長毅、久米秀明
権利者：独立行政法人医薬基盤研究所
種類：特許
番号：特願 2014-110293
出願年月日：平成 26 年 5 月 28 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

久米 秀明 (KUME, Hideaki)
独立行政法人医薬基盤研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・研究員
研究者番号：50322714

(2)研究分担者

朝長 毅 (TOMONAGA, Takeshi)
独立行政法人医薬基盤研究所・プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー
研究者番号：80227644

松原 久裕 (MATSUBARA, Hisahiro)
千葉大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20282486